

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年12月24日 (24.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/107011 A1(51) 国際特許分類7:  
33/66, 21/77, 31/00, C12Q 1/26

G01N 33/72,

(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO &amp; PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒530-6026 大阪府 大阪市 北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/05486

(22) 国際出願日: 2003年4月28日 (28.04.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-174896 2002年6月14日 (14.06.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 米原聰 (YONEHARA, Satoshi) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区 東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 石丸香 (ISHIMARU, Kaori) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区 東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 平井香 (HIRAI, Kaoru) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区 東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ASSAY WITH SULFONIC ACID COMPOUND AND NITRO COMPOUND

(54) 発明の名称: スルホン酸化合物およびニトロ化合物を用いた測定方法

WO 03/107011 A1

(57) Abstract: A method for determining a substance in a sample through an oxidation-reduction reaction, which gives found values with excellent reliability. Prior to the oxidation-reduction reaction, at least either of a sulfonic acid compound and a nitro compound is added to the sample to eliminate the influence of hemoglobin and any hemoglobin decomposition products as reducible substances contained in the sample. Subsequently, a reduction or oxidation product derived from the substance to be assayed is caused to generate, and the amount thereof is measured by an oxidation-reduction reaction. The amount of the substance to be assayed is determined from the found value. The sulfonic acid compound may be sodium lauryl sulfate, and the nitro compound may be 4-nitrophenol, etc.

(57) 要約: 試料中の測定対象物を酸化還元反応を用いて測定する方法であって、信頼性に優れる測定値が得られる測定方法を提供する。前記酸化還元反応に先立ち、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を試料に添加して、前記試料中に含まれるヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の還元物質としての影響を排除し、その後、前記測定対象物由来の還元物質または酸化物質を発生させ、この量を酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定する。スルホン酸化合物としては、ラウリル硫酸ナトリウム、ニトロ化合物としては、4-ニトロフェノール等が使用できる。

## 明細書

## スルホン酸化合物およびニトロ化合物を用いた測定方法

## 技術分野

本発明は、試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法に関する。

## 背景技術

従来から、酸化還元反応を利用して、試料中の測定対象物の量を測定することは、広く実施されており、例えば、生化学分析や臨床検査等における糖化タンパク質の測定にも適用されている。

例えば、血液中の糖化タンパク質、特に赤血球中の糖化ヘモグロビンは、生体血糖値の過去の履歴を反映しているため、糖尿病診断や治療等における重要な指標とされている。このような赤血球中の糖化タンパク質は、前記酸化還元反応を用いて、例えば、以下に示すようにして測定されている。

まず、赤血球を溶血させた試料を調製し、この溶血試料をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「F A O D」という）で処理し、前記 F A O D を糖化タンパク質の糖化部分に作用させて過酸化水素を発生させる。この過酸化水素量は、前記糖化タンパク質量に対応する。そして 20 、この試料に、さらに、ペルオキシダーゼ（以下、「P O D」という）および酸化により発色する基質（発色基質）等を添加し、前記 P O D を触媒として前記過酸化水素と前記発色基質との間で酸化還元反応させる。この時、酸化によって前記酸化基質が発色するため、この発色を測定することによって前記過酸化水素量を測定でき、この結果、赤血球中の

糖化タンパク質量を知ることができる。

しかし、血液中には、通常、アスコルビン酸（A s A）、ビリルビン等の各種還元物質が存在し、さらに、赤血球中には、グルタチオン（G S H）等の各種還元物質が存在する。これらの還元物質によって、例え  
5 ば、前記過酸化水素が還元されたり、前記酸化還元反応が阻害されたり、前記還元剤が発色した後に還元され退色するおそれがある。このため、赤血球中の糖化タンパク質量を正確に測定することが困難であるとい  
う問題があった。

また、試料ごとによって、含まれる還元物質の濃度も一定ではないた  
10 め、測定精度が劣るという問題もあった。

このような問題を回避するために、例えば、種々の酸化剤を前記試料に添加するという方法がある。例えば、特開昭56-151358号公報には、酸化剤としてヨウ素酸、過ヨウ素酸等のハロゲン酸化物を用いる方法が開示されており、特開昭57-13357号公報、特開昭57-161650号公報、特開昭59-193354号公報、特開昭62-169053号公報、特開平3-30697号公報には、酸化剤としてコバルト、鉄、セリウム等の金属錯体を用いる方法が開示されている。  
。

## 20 発明の開示

しかしながら、これら従来の方法では、試料によっては測定精度が十分に向上しない場合もある。また、前述のように、血液中の糖化タンパク質は、糖尿病診断や治療等における重要な指標とされているため、これを測定するための酸化還元反応を用いた測定方法においても、更なる測定精度の向上が望まれている。  
25

そこで、本発明の目的は、試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用

いて測定する方法であって、信頼性に優れる測定値が得られる測定方法の提供である。

前記目的を達成するために、本発明の測定方法は、ヘモグロビンまたはヘモグロビン分解物を含む試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法であって、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を前記試料に添加して、前記試料に含まれる前記ヘモグロビンまたはヘモグロビン分解物の影響を排除することを特徴とする。

本発明者らは、(i) 前記従来の方法では、前記A s AやG S Hのような低分子量還元物質の影響は排除されるが、タンパク質等のような高分子量還元物質による影響が排除されないこと、さらに、(ii) 試料をテトラゾリウム化合物で処理すれば、前記低分子量還元物質だけでなく、前記高分子量還元物質、特にヘモグロビンやヘモグロビン分解物(以下、両者あわせて「ヘモグロビン」という)の酸化還元物質としての影響も排除できることを見出した。なお、これについて、本出願人は別途出願している。しかしながら、前記テトラゾリウム化合物は、溶解性が低いため、試料中に高濃度に含まれるヘモグロビンに対応させ難く、また、テトラゾリウム化合物自体が酸化力を有するため、酸化により発色する前記基質に作用して、誤発色を生じるおそれがあるという問題があった。そこで、本発明者らは、測定系に影響を与えるヘモグロビンの影響を排除すべく、さらに鋭意研究を行った。その結果、試料をスルホン酸化合物やニトロ化合物で処理することによって、測定系に影響を与えることなくヘモグロビンの影響を防止できることを見出し、本発明に到達した。このような本発明の測定方法によれば、よりいっそう高精度な測定が可能となるため、前述のような臨床医療等における各種検査に有用である。

## 発明を実施するための最良の形態

前述のように本発明の測定方法は、試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法であって、前記試料にスルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を添加することを特徴とし、これによって試料中に含まれるヘモグロビンの測定系に対する影響が排除される。

具体的には、前記酸化還元反応に先立ち、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を前記試料に添加して前記試料中のヘモグロビンまたはヘモグロビン分解物の影響を排除し、その後、前記測定対象物由来の酸化物質または還元物質を発生させ、この量を酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定することが好ましい。

本発明において、ヘモグロビンの影響を排除するために添加する物質は、例えば、スルホン酸化合物およびニトロ化合物のいずれか一方でもよいが、より一層影響を排除できることから、前記両化合物を前記試料に添加することが好ましい。なお、スルホン酸化合物とニトロ化合物の両方を添加する場合、添加の順序は制限されず、両方を同時に添加してもよいし、別々に添加してもよい。

20

本発明において、前記スルホン酸化合物としては、例えば、

一般式  $R-SO_3X$

で表わされる化合物が使用できる。前記式において、Xは、例えば、N<sub>a</sub>、K、Li、H等であり、Rは、疎水基であることが好ましく、例えば、 $CH_3(CH_2)_n-$ 、 $CH_3(CH_2)_n-C_6H_4-$ 、 $C_6H_5-$ 、 $C_6H_5-N=N-C_6H_4-$ 、 $C_6H_5-CH=C$  H-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-等があげられる。前記Rにおけるnは、例えば、1～20の範

囲である。なお、前記Rにおいて、「H」は、アシル基、ニトロ基、ニトロソ基、フェニル基、アルキル基、アルキルエーテル基等で置換されてもよい。

前記スルホン酸化合物の具体例としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム（以下、「SLS」という）、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（以下、「SDBS」という）、ラウリル硫酸リチウム（以下、「LiLS」という）、4-アミノアゾベンゼン-4'-スルホン酸ナトリウム（以下、「ABSA」という）、4-アミノ-4'-ニトロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム（以下、「ANDS」という）、4,4'-ジアゾスチルベンゼン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム（以下、「DADS」という）、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸、N-シクロヘキシル-2-ハイドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸、ピペラジン-1,4-ビス（2-エタンスルホン酸）、バソフェナントロリンスルホン酸等が使用でき、より好ましくは、SLS、SDBS、LiLSである。

本発明において、前記ニトロ化合物としては、特に制限されないが、例えば、ニトロベンゼン化合物やジニトロベンゼン化合物等があげられる。これらの化合物は、ベンゼン環が、ニトロ基の他に、例えば、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ （ $n = 2 \sim 9$ ）等の置換基を有することが好ましく、これらの中でも親水基を置換基として有することが好ましい。前記置換基としては、例えば、ハロゲン基、エーテル基、フェニル基などがあげられる。

前記ニトロ化合物の具体例としては、例えば、2,4-ジニトロフェノール（2,4-DNP）、2,5-ジニトロフェニル、2,6-ジニトロフェニル、4,6-ジニトロ-2-メチルフェノール、2-アミノ-4-ニトロフェノール、2-アミ

ノ-5-ニトロフェノール、2-アミノ-4-ニトロフェノール、p-ニトロフェノール(p-NP)、2,4-ジニトロアニリン(2,4-DNA)、p-ニトロアニリン(p-NA)、亜硝酸ナトリウム(NaNO<sub>2</sub>)、亜硝酸カリウム(KNO<sub>2</sub>)、4-アミノ-4'-ニトロスチルベン-2,2'-シスルホン酸2ナトリウム(以下、「ANPS」という)、ニトロベンゼン等が使用できる。

また、スルホン酸化合物とニトロ化合物とを併用する場合、これらの組み合せは特に制限されない。

これらのスルホン酸化合物やニトロ化合物は、例えば、前述のようなテトラゾリウム化合物に比べて溶解性に優れるため、試料中のヘモグロビン濃度が高濃度であっても処理が容易であり、また、コストの面でも低価格であるため、非常に有用である。

本発明の測定方法において、前記スルホン酸化合物やニトロ化合物の添加量は、特に制限されず、例えば、試料の種類、前記試料に含まれるヘモグロビンの量やその他の還元物質の量等などによって適宜決定できる。具体的な例を以下に示す。

スルホン酸化合物およびニトロ化合物のいずれか一方を添加する場合は、例えば、試料1μl当たり、いずれかの化合物を、0.01~1.000μmolの範囲になるように添加することが好ましく、より好ましくは0.03~2.00μmolの範囲、特に好ましくは、0.05~4.0μmolの範囲である。

また、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を添加する場合は、例えば、試料1μl当たり、前記スルホン酸化合物0.005~2.0μmolの範囲、ニトロ化合物0.005~2.5μmolの範囲で添加することが好ましく、より好ましくはスルホン酸化合物0.02~4.0μ

mo1の範囲、ニトロ化合物0.01~5μmo1の範囲である。

本発明において、前記酸化還元反応は、酸化酵素により、前記測定対象物由来の酸化物質を還元し、かつ、酸化により発色する基質（発色基質）を酸化させる発色反応であり、前記酸化物質の量の測定が、前記発色反応による発色の程度の測定であることが好ましい。前記発色程度の測定は、例えば、前記基質の検出波長における吸光度測定によって行うことができる。

前記発色基質としては、例えば、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム（以下、「DA-64」という）、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとの組み合せ、N,N,N',N',N',N',-ヘキサ(3-スルホプロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタンヘキサリテイウム塩（以下、「TPM-PS」という）、N,N,N',N',N',N''-ヘキサ(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタンヘキサリテイウム塩（以下、「TPM-OS」という）、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンナトリウム塩（以下、「DA-67」という）、10-(メチルアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン（以下、「MCDP」という）、10-(カルボキシアミノメチル-4-ペニソアミノカルボニル)3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンナトリウム塩（以下、「MMX」という）等が使用できる。これらの中でも、例えば、TPM-PS、TPM-OS等のトリフェニルメタン系の発色基質が好ましく、その中でも特にトリアミノトリフェニルメタン系の発色基質が好ましい。

前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげられる。また、前記トリンダー試薬と組み合わせる化合物としては、前記4-アミノアンチピリンの他に、例えば、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチ

ルベンズチアゾリノンヒドラゾン（M B T H）、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン（S M B T H）等も使用できる。

以上に例示する発色基質は、通常、400 nm以上に吸収を持つため、同様に400 nmに吸収を持つ前述のようなテトラゾリウム化合物を5 使用した場合、テトラゾリウム化合物の存在によって測定値に誤差が生じるおそれがあった。しかし、例示した前記スルホン酸化合物やニトロ化合物は、400 nm以上に吸収を持たないため、これらの発色基質と共に使用しても、吸光度測定において誤差が生じるおそれがない。

10 また、これらの発色基質と、前記スルホン酸化合物およびニトロ化合物との組み合せは、特に制限されないが、発色反応が精度良く行われることから、例えば、以下の組み合せが好ましい。なお、この発色基質と、スルホン酸化合物およびニトロ化合物との組み合せに応じて、発色反応の精度向上が見られることの理由は不明である。

15 前記発色基質が、DA-64、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとの組み合せ等の場合、前記スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を前記試料に添加することが好ましく、例えば、前記スルホン酸化合物としては、SLS、SDBS、LiLSを、ニトロ化合物としては2,4-DNA、2,4-DNP、PNA、PNPを使用することが好ましい。

20 一方、前記発色基質が、TPM-PS、TPM-OS、DA-67、MCDP、MMX等の場合、スルホン酸化合物を前記試料に添加することが好ましく、より好ましくは、スルホン酸化合物とニトロ化合物の両方を添加する。

25 本発明において、前記測定対象物由来の酸化物質は、過酸化水素であることが好ましく、前記酸化酵素は、ペルオキシダーゼであることが好ましい。

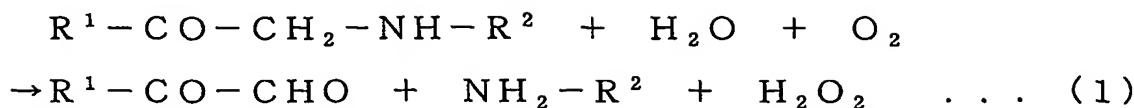
本発明の測定方法において、前記測定試料は、特に制限されないが、全血、血漿、血清、血球等の血液試料の他に、例えば、尿、髄液、唾液等の生体試料や、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等もあげられる。  
5

本発明の測定方法において、前記測定対象物は、酸化還元反応を利用するものであれば特に制限されないが、例えば、全血中成分、赤血球内成分、血漿中成分、血清中成分等もあげられ、好ましくは赤血球内成分である。また、具体的には、例えば、糖化ヘモグロビンや糖化アルブミン等の糖化タンパク質、糖化ペプチド、糖化アミノ酸、グルコース、尿酸、コレステロール、クレアチニン、サルコシン、グリセロール等があげられ、より好ましくは糖化タンパク質である。例えば、前記赤血球成分を測定する場合、全血をそのまま溶血させたものを試料としてもよいし、全血から赤血球を分離して、前記赤血球を溶血させたものを試料として用いてもよい。  
10  
15

本発明の測定方法において、前記測定対象物が糖化タンパク質の場合、前記糖化タンパク質にFAODを作用させることによって、前記測定対象物由来の酸化合物物質として過酸化水素を発生させることが好ましい。前記糖化タンパク質の糖化部分がFAODで酸化分解され、過酸化水素が生成するのである。また、前記糖化ペプチド、糖化アミノ酸等の糖化アミンも、同様にFAODを作用させることが好ましい。なお、前記糖化タンパク質や糖化ペプチドは、必要に応じて、前記FAOD処理前に、プロテアーゼ処理することが好ましい。  
20  
25

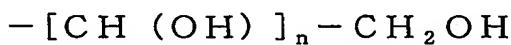
前記FAODとしては、下記式(1)に示す反応を触媒するFAOD

であることが好ましい。



5

前記式(1)において、R<sup>1</sup>は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基(糖残基)を示す。前記糖残基(R<sup>1</sup>)は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基(R<sup>1</sup>)は、グルコース残基(アルドース残基)となる。この糖残基(R<sup>1</sup>)は、例えば、



で示すことができ、nは、0~6の整数である。

前記式(1)において、R<sup>2</sup>は、特に制限されないが、例えば、糖化アミノ酸、糖化ペプチドまたは糖化タンパク質の場合、α-アミノ基が糖化されている場合と、それ以外のアミノ基が糖化されている場合とで異なる。

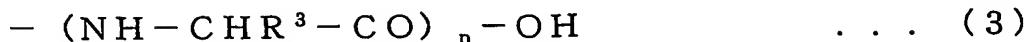
前記式(1)において、α-アミノ基が糖化されている場合、R<sup>2</sup>は

、下記式(2)で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。



前記式(2)において、R<sup>3</sup>はアミノ酸側鎖基を示す。また、R<sup>4</sup>は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式(3)で示すことができる。下記式(3)において、nは、0以上の整数であ

り、R<sup>3</sup>は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。

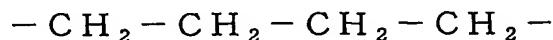


5 また、前記式(1)において、α-アミノ基以外のアミノ基が糖化されている(アミノ酸側鎖基が糖化されている)場合、R<sup>2</sup>は下記式(4)で示すことができる。



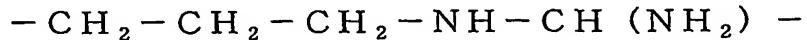
10

前記式(4)において、R<sup>5</sup>は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、R<sup>5</sup>は



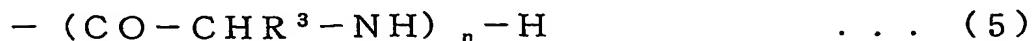
15 であり、

例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、R<sup>5</sup>は、



である。

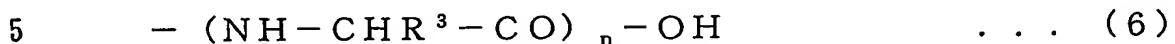
また、前記式(4)において、R<sup>6</sup>は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(5)で示すことができる。なお、下記式(5)において、nは0以上の整数であり、R<sup>3</sup>は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。



25

また、前記式(4)において、R<sup>7</sup>は、水酸基、アミノ酸残基または

ペプチド残基であり、例えば、下記式（6）で示すことができる。なお、下記式（6）において、 $n$  は 0 以上の整数であり、 $R^3$  は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示す。



（実施形態 1）

つぎに、本発明の測定方法について、血球中の糖化タンパク質を測定する例をあげて説明する。

10        まず、全血をそのまま溶血し、または全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離してこれを溶血し、溶血試料を調製する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、前記界面活性剤を用いる方法が好ましい。

15        前記界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニル エ-テル（T r i t o n 系界面活性剤等）、ポリオキシエチレン タリヒ' タン アルキル エステル（T w e e n 系界面活性剤等）、ポリオキシエチレン アルキル エ-テル（B r i j 系界面活性剤等）等の非イオン性界面活性剤が使用でき、具体的には、例えば、T r i t o n X-100、T w e e n - 20、B r i j 35 等があげられる。前記界面活性剤による処理条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が、1～10 体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が 0.01～5 重量%となるように前記界面活性剤を添加し、室温で、数秒（約 5 秒）～10 分程度攪拌すればよい。

25        つぎに、前記溶血試料に対して、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を添加し、前記溶血試料の前処理を行う。

前記スルホン酸化合物とニトロ化合物は、いずれか一方でもよいし、両方を添加してもよいが、前述のように後の工程で使用する発色基質の種類によって、適宜決定することが好ましい。

スルホン酸化合物およびニトロ化合物のいずれか一方を添加する場合 5 、その添加量は特に制限されず、前述の添加割合があげられる。具体的には、この前処理溶液中の血球濃度が1体積%の場合、例えば、ニトロ化合物の濃度が0.05～500mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.2～100mmol/Lの範囲である。また、この前処理溶液中の血球濃度が1体積%の場合、例えば、スルホン酸化合物の濃度が0. 10 0.05～200mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.2～40mmol/Lの範囲である。

また、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を試料に添加する場合も、その添加量は特に制限されず、例えば、前述の添加割合があげられる。具体的には、この前処理溶液中の血球濃度が、1体積%の場合 15 、例えば、スルホン酸化合物濃度0.05～200mmol/L、ニトロ化合物濃度0.05～250mmol/Lの範囲であり、好ましくはスルホン酸化合物濃度0.2～40mmol/L、ニトロ化合物濃度0. 1 1～50mmol/Lの範囲である。このようにスルホン酸化合物とニトロ化合物との両方を添加する場合、前述のように、いずれを先に添加してもよいし、また同時に添加してもよい。

前記スルホン酸化合物およびニトロ化合物は、そのまま使用してもよいが、操作の簡便性や処理効率等の点から、溶媒に溶解したスルホン酸化合物溶液またはニトロ化合物溶液として使用することが好ましい。前記各溶液の濃度は、その種類等により適宜決定でき、例えば、スルホン酸化合物溶液は、5～1000mmol/Lの範囲であり、好ましくは25 5～400mmol/Lの範囲であり、ニトロ化合物溶液は、0.5～

100 mmol/L の範囲であり、好ましくは 1~50 mmol/L の範囲である。前記溶媒としては、例えば、蒸留水、生理食塩水、緩衝液等が使用でき、前記緩衝液としては、例えば、後述の緩衝液等が使用できる。なお、前記両化合物は、それぞれ一種類でもよいし、二種類以上 5 を併用してもよい。

この前処理は、通常、緩衝液中で行われる。前記緩衝液としては、例えば、アミン系緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、ならびに MOPS、CHES、CAPS および CAPSO 等のグッド緩衝液等が使用できる。前記アミン系緩衝液の緩衝剤としては、例えば、グリシン、エチルアミン、ジエチルアミン、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリスヒドロキシアミノメタン、トリエタノールアミン、グリシンアミド等があげられる。

前記緩衝液の pH は、pH 7~12 の範囲が好ましく、より好ましくは pH 8~11 の範囲であり、特に好ましくは pH 8~10 の範囲である。 15

この前処理の条件は、特に制限されないが、通常、温度 10~37°C の範囲であり、処理時間 10 秒~60 分の範囲である。

なお、この前処理に使用するスルホン酸化合物として、前述のようなラウリル硫酸ナトリウム等を使用する場合は、これ自身が界面活性剤としての作用を奏するため、例えば、前述のような溶血処理と、この前処理とを同じ物質（ラウリル硫酸ナトリウム等）の添加によって、同時に 20 行うことが可能である。

つぎに、この前処理済み溶血試料に対し、プロテアーゼ処理を行う。 25 これは、後の処理に使用する F A O D を測定対象物に作用し易くするためである。

前記プロテアーゼの種類は、特に制限されず、例えば、プロテアーゼK、ズブチリシン、トリプシン、アミノペプチダーゼ、メタロプロテアーゼ等が使用できる。プロテアーゼ処理の条件は、使用するプロテアーゼの種類、測定対象物である糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

具体的には、例えば、前記プロテアーゼとしてプロテアーゼKを用いて前記前処理済み溶血試料を処理する場合、通常、反応液中のプロテアーゼ濃度10～30, 000 mg/L、反応液中の血球濃度0.05～1.5体積%、反応温度15～37℃、反応時間1分～24時間、pH 6～12の範囲である。このプロテアーゼ処理は、通常、緩衝液中で行われる。前記緩衝液としては、例えば、前記前処理と同様の緩衝液が使用できる。

つぎに、前記プロテアーゼ処理により得られた分解物を、前記F A O Dで処理する。このF A O D処理により、前記式(1)に示す反応が触媒される。

このF A O D処理は、前記プロテアーゼ処理と同様に緩衝液中で行うことが好ましい。その処理条件は、使用するF A O Dの種類、測定対象物である糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

具体的には、例えば、反応液中のF A O D濃度50～50, 000 U/L、反応液中の血球濃度0.01～1体積%、反応温度15～37℃、反応時間1～60分、pH 6～9の範囲である。前記緩衝液の種類も特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。

25

つぎに、前記F A O D処理で生成した過酸化水素を、P O Dおよび前

記発色基質を用いて酸化還元反応により測定する。

前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、前記生成した過酸化水素の濃度等により適宜決定される。通常、反応液中の P O D 濃度 10～100, 000 IU/L、発色性基質濃度 0.005～5 30 mmol/L、反応温度 15～37°C、反応時間 0.1～30 分、pH 5～9 である。また、前記緩衝液は、特に制限されず、例えば、前記プロテアーゼ処理および F A O D 処理等と同様の緩衝液等が使用できる。

前記酸化還元反応において、例えば、前記発色性基質を用いた場合、  
10 前記反応液の発色程度（吸光度）を分光光度計で測定することにより、過酸化水素の量を測定できる。そして、この過酸化水素濃度と検量線等とを用いて、試料中の糖化タンパク質量を求めることができる。

なお、前記過酸化水素量は、前記 P O D 等を用いた酵素的手法の他に  
15 、例えば、電気的手法により測定することもできる。

この測定方法において、前記スルホン酸化合物やニトロ化合物による前処理工程は、前述のように、酸化還元反応が実質的に生じる前であれば、特に制限されないが、前記 F A O D 処理後に過酸化水素が発生することから、前記 F A O D 処理前に行なうことが好ましい。また、各処理工程は、前述のように別々に行ってもよいが、例えば、以下に示すような組み合せで同時に行ってもよい処理工程がある。

- 1 : 溶血処理 + 前処理
- 2 : 溶血処理 + 前処理 + プロテアーゼ処理
- 25 3 : プロテアーゼ処理 + F A O D 処理
- 4 : F A O D 処理 + P O D 酸化還元処理

## 5：プロテアーゼ処理+FAOD処理+POD酸化還元処理

また、スルホン酸化合物やニトロ化合物の添加順序や、前記FAOD、PODおよび発色性基質の添加順序も特に制限されない。

5 このような方法によれば、前記試料にスルホン酸化合物やニトロ化合物を接触させることにより、GSH、ASA、ジチオスレイトール、システイン、N-アセチルシステイン等の低分子量還元物質だけでなく、特にヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の還元物質としての影響を十分に排除することができる。このため、例えば、酸化還元反応反応や吸光度測定になんら影響を与えることなく、高精度で測定を行うことができる。  
10

また、本発明の測定方法の前記前処理工程において、例えば、前記スルホン酸化合物やニトロ化の他に、さらに酸化剤や酵素を併用してもよい。前記酸化剤としては、例えば、ヨード酢酸ナトリウム、ヨウ素酸、過ヨウ素酸等のハロゲン酸化物、EDTA-F<sub>e</sub>等があげられ、酵素としては、例えば、アスコルビン酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ等が使用できる。このような酸化剤の添加量は、例えば、試料1μl当たり0.001~0.1mgの範囲である。

20 本発明の測定方法において、測定対象物は、酸化還元反応を利用するものであれば、特に制限されず、前記糖化タンパク質の他に、前述のように、糖化ペプチド、糖化アミノ酸、グルコース、コレステロール、尿酸、クレアチニン、サルコシン、グリセロール等があげられる。

25 過酸化水素を発生させて、前記各測定対象物の量を測定する場合は、例えば、前記グルコースにはグルコースオキシダーゼを、前記コレステ

ロールにはコレステロールオキシダーゼを、前記尿酸にはウリカーゼを、前記クレアチニンにはサルコシンオキシダーゼを、前記サルコシンにはサルコシンオキシダーゼを、前記グリセロールにはグリセロールオキシダーゼを、それぞれ作用させて過酸化水素を発生させればよい。この  
5 過酸化水素量の測定方法は、前述と同様にして行うことができる。また、糖化ペプチド、糖化アミノ酸は、例えば、前記糖化タンパク質の測定と同様にして測定できる。

また、前記スルホン酸化合物やニトロ化合物による試料中のヘモグロ  
10 ピンおよびヘモグロビン分解物の処理後、測定対象物由来の還元物質を発生させ、この量を酸化還元反応により測定し、この測定値から、前記測定対象物の量を決定する場合は、例えば、以下に示すようにして測定を行うことができる。

例えば、前記測定対象物がグルコースの場合、例えば、NAD<sup>+</sup>やN  
15 ADP<sup>+</sup>等の存在下、グルコースデヒドロゲナーゼを用いて、NADHやNADPH等の還元物質を発生させる。そして、前記測定対象物由来の還元物質であるNADHやNADPHを、例えば、ジアホラーゼと、還元により発色する基質とを用いて、酸化還元反応により測定する。そして、前述のように、この測定対象物由来の還元物質の濃度と検量線等とを用いて、試料中の測定対象物の量を求めることができる。また、例えば、測定対象物がコレステロールの場合はコレステロールデヒドロゲナーゼを、サルコシンの場合は、サルコシンデヒドロゲナーゼをそれぞれ使用できる。

前記還元により発色する基質としては、特に制限されないが、例えば  
25 、前記発色性のテトラゾリウム化合物や、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール等が使用できる。

## 実施例

つぎに、実施例について比較例と併せて説明する。

### 5 (実施例 1)

この実施例は、発色性基質としてTPM-PSを使用して、フルクトシルバルリン（以下、「F V」という）を含むヘモグロビン試料を、スルホン酸化合物およびニトロ化合物で処理し、F V量を測定した例である。以下に、使用した試料、試薬および方法を示す。

10

#### (測定試料の調製)

ヘモグロビン凍結品を精製水で溶解し、50 g/Lのヘモグロビン溶液を調製した。一方、F Vを、特開平2-69644号公報にしたがつて製造し、これを精製水に溶解して1 mMのF V溶液を調製した。そして、前記ヘモグロビン溶液37 μl、F V溶液60 μlおよび精製水203 μlを混合して、測定試料とした。

#### (第1試薬)

スルホン酸化合物	3.2 mM、6.4 mMまたは12.8 mM
界面活性剤 (ポリオキシエチレン(9)ドーティルエーテル)	1. 85 g/L
CHES-CHES・Na緩衝液 (pH9.4)	4.0 mM
MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH9.4)	1.5 mM

前記第1試薬のスルホン酸化合物としては、SLS (カライテスク社製)、SDBS (和光純薬社製)、ABSA (東京化成社製)、ANDS (東京化成社製)、DADS (東京化成社製)をそれぞれ使用した。

## (第2試薬)

ニトロ化合物 (2,4-DNA:和光純薬社製)	0mM 又は 6.4mM
メタロプロテアーゼ (アークレイ社製)	2.0MU/L
5 CaCl <sub>2</sub>	2.5mM
NaCl	50mM
MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH6.5)	1.0mM

## (第3試薬)

10 F A O D (アークレイ社製)	18KU/L
P O D (キッコーマン社製)	67KU/L
CaCl <sub>2</sub>	2.5mM
TPM-PS (同仁化学社製)	0.25mM
ADA緩衝液 (pH7.0)	300mM

15

## (方法)

前記測定試料 0.14 μL に前記第1試薬 8.26 μL を添加した後、さらに、前記第2試薬 75.6 μL を混合して、37°Cで5分間放置した。そして、この混合液に前記第3試薬 18.9 μL を混合し、37°Cでインキュベートして発色反応を行った。そして、5分後の吸光度を商品名 JCA-BM8 (日本電子社製) で測定した。測定波長は、主波長 571 nm、副波長 805 nm とした。一方、比較例としては、第1試薬のスルホン酸化合物、第2試薬のニトロ化合物を添加していない以外は、前記実施例と同様にして吸光度の測定を行った。なお、試料に第1試薬および第2試薬を混合した時点での、試料 1 μL に対するスルホン酸化合物の添加量は、0.189 μmol、0.378 μmol、0.

755 μm o l であり、ニトロ化合物の添加量は、3.46 μm o l で  
あつた。

(表1)

		スルホン酸化合物 (mM)	ニトロ化合物 (mM)	吸光度 (mAbs)
5	実施例1-1	SLS (3.2)	2,4-DNA (0.9)	149
	1-2	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	154
	1-3	SLS (12.8)	2,4-DNA (0.9)	160
	1-4	SDBS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	121
10	1-5	SLS (6.4)	—	154
	1-6	ABSA (6.4)	—	132
	1-7	ANDS (6.4)	—	113
	1-8	DADS (6.4)	—	124
	比較例 1	—	—	30

15

前記表1に示すように、実施例1のように、各種スルホン酸化合物またはこれらとニトロ化合物との併用によって、比較例に比べて、試料中のF V量を示す吸光度が増加した。この結果から、本実施例によれば、前記スルホン酸化合物およびニトロ化合物によって、試料中のヘモグロビンの影響が排除されたことがわかる。

## (実施例2)

この実施例は、発色性基質としてDA-64を使用して、F Vを含むヘモグロビン試料を、スルホン酸化合物およびニトロ化合物で処理し、F V量を測定した例である。以下に、使用した試料、試薬および方法を示す。

## (測定試料の調製)

前記実施例1において調製したヘモグロビン溶液60μLと、前記FV溶液37μLおよび精製水203μLを混合して、測定試料とした。

5

## (第1試薬)

スルホン酸化合物 (SLS: カライテスク社製)	6. 4 mM
界面活性剤 (ポリオキシエチレン(9)ラウリルエーテル)	1. 85 g/L
CHES-CHES・Na緩衝液 (pH9.4)	4.0 mM
10 MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH9.4)	1.5 mM

## (第2試薬)

ニトロ化合物	0. 9 mM
メタロプロテアーゼ (アーカレイ社製)	2. 0 MU/L
15 CaCl <sub>2</sub>	2. 5 mM
NaCl	5.0 mM
MOPS-MOPS・Na緩衝液 (pH6.5)	1. 0 mM

前記ニトロ化合物としては、2,4-DNA (和光純薬工業社製)、p-NA (和光純薬工業社製)、p-NP (和光純薬工業社製)、NaNO<sub>2</sub> (カライテスク社製)、2,4-DNH (和光純薬工業社製)をそれぞれ使用した。なお、ニトロ化合物を二種類添加する場合は、それぞれ0. 9 mMとし、合計1. 8 mMとした。

25

## (第3試薬)

F A O D (アークレイ社製)	1 7 . 5 K U / L
P O D (キッコーマン社製)	6 7 K U / L
DA-64 (和光純薬工業社製)	7 0 $\mu$ M
5 Tris-HCl緩衝液 (pH7.0)	3 0 0 mM

## (方法)

前記測定試料 0. 1 4  $\mu$  L に前記第1試薬 8. 2 6  $\mu$  L を添加した後  
、さらに、前記第2試薬 7 5. 6  $\mu$  L を混合して、3 7 °Cで5分間放置  
10 した。そして、この混合液に前記第3試薬 1 8. 9  $\mu$  L を混合し、3 7  
°Cでインキュベートして発色反応を行った。そして、5分後の吸光度を  
商品名 J C A - B M 8 (日本電子社製) で測定した。測定波長は、主波  
長 7 5 1 nm、副波長 8 0 5 nm とした。一方、比較例としては、第1  
試薬のスルホン酸化合物、第2試薬のニトロ化合物を添加してない以外  
15 は、前記実施例と同様にして吸光度の測定を行った。これらの結果を下  
記表2に示す。

(表2)

	スルホン酸化合物 (mM)	ニトロ化合物 (mM)	吸光度 (mAbs)	
実施例 2-1	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	51.3	
2-2	SLS (6.4)	p-NA (0.9)	41.0	
5	2-3	SLS (6.4)	p-NP (0.9)	41.5
2-4	SLS (6.4)	NaN <sub>2</sub> (0.9)	41.5	
2-5	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	277.0	
		p-NP (0.9)		
10	2-6	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	279.0
		p-NA (0.9)		
2-7	SLS (6.4)	p-NP (0.9)	267.0	
		p-NA (0.9)		
15	2-8	SLS (6.4)	2,4-DNA (0.9)	257.0
		NaN <sub>3</sub> (0.9)		
比較例 1	—	—	2.1	

前記表2に示すように、実施例2は、スルホン酸化合物および各種ニトロ化合物の併用によって、比較例に比べて、試料中のFV量を示す吸光度が増加した。さらに、ニトロ化合物を二倍量添加することによって、より一層吸光度が増加した。これらの結果から、本実施例によれば、前記スルホン酸化合物およびニトロ化合物によって、試料中のヘモグロビンの影響が排除されたことがわかる。

#### 産業上の利用の可能性

以上のように、本発明の測定方法は、前記スルホン酸化合物やニトロ化合物を試料に添加することにより、試料中のヘモグロビンの還元物質

としての影響を排除できるため、信頼性に優れた測定を行うことができる。したがって、本発明の測定方法は、例えば、臨床医療における各種分析に適用でき、特に、糖尿病診断において重要である、赤血球中の糖化ヘモグロビン等の糖化タンパク質の測定に有用である。

## 請求の範囲

1. ヘモグロビンまたはヘモグロビン分解物を含む試料中の測定対象物を、酸化還元反応を用いて測定する方法であって、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を前記試料に添加して、前記試料に含まれる前記ヘモグロビンまたはヘモグロビン分解物の影響を排除することを特徴とする測定方法。  
5
2. 前記酸化還元反応に先立ち、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を前記試料に添加して前記試料に含まれるヘモグロビンまたはヘモグロビン分解物の影響を排除し、その後、前記測定対象物由来の酸化物質または還元物質を発生させ、この量を前記酸化還元反応により測定し、この測定値から前記測定対象物の量を決定する請求の範囲1記載の測定方法。  
10
3. スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を前記試料に添加する請求の範囲1記載の測定方法。  
15
4. 前記スルホン酸化合物が、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) 、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (SDS) 、ラウリル硫酸リチウム (LILS) 、4-アミノアゾベンゼン-4' -スルホン酸ナトリウム (ABSA) 、4-アミノ-4' -ニトロスチルベン-2,2' -ジスルホン酸2ナトリウム (ANDS) および4,4' -ジアゾスチルベンゼン-2,2' -ジスルホン酸2ナトリウム (DADS) からなる群から選択された少なくとも一つである請求の範囲1記載の測定方法。  
20  
25

5. 前記ニトロ化合物が、2,4-ジニトロフェノール (2,4-DNP) 、p-ニトロフェノール (p-NP) 、2,4-ジニトロアニリン (2,4-DNA) 、p-ニトロアニリン (p-NA) 、亜硝酸ナトリウム (NaNO<sub>2</sub>) 、亜硝酸カリウム (KNO<sub>2</sub>) 、4-アミノ-4'-ニトロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸 2 ナトリウム (ANPS) 5 およびニトロベンゼンからなる群から選択された少なくとも一つである請求の範囲 1 記載の測定方法。
6. 前記酸化還元反応が、酸化酵素により、前記測定対象物由来の酸化物質を還元し、かつ、酸化により発色する基質を酸化させる発色反応 10 であり、前記酸化物質の量の測定が、前記発色反応による発色程度の測定である請求の範囲 2 記載の測定方法。
7. 前記発色程度の測定が、前記基質の検出波長における吸光度測定 15 である請求の範囲 6 記載の測定方法。
8. 前記測定対象物由来の酸化物質が、過酸化水素である請求の範囲 2 記載の測定方法。
9. 前記酸化酵素が、ペルオキシダーゼである請求の範囲 6 記載の測定方法。 20
10. 測定対象物が、糖化タンパク質、糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸からなる群から選択された少なくとも一つであって、前記測定対象物にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させることによって、前記測定対象物の酸化物質として過酸化水素を発生させる請求の範囲 2 記載の測定方法。 25

11. 前記測定対象物に前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させる前に、前記試料にスルホン酸化合物およびニトロ化合物の少なくとも一方を添加する請求の範囲 10 記載の測定方法。

5

12. 前記酸化により発色する基質が、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(シメチルアミノ)シフェニルアミンナトリウム、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとの組み合せ、N,N,N',N',N',N'-ヘキサ(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタンヘキサリテイウム塩、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)3,7-ビス(シメチルアミノ)フェノチアシンナトリウム塩、10-(メチルアミノカルボニル)3,7-ビス(シメチルアミノ)フェノチアシンおよび10-(カルボキシアミノメチル-4-ヘンツアミノカルボニル)3,7-ビス(シメチルアミノ)フェノチアシンナトリウム塩からなる群から選択された少なくとも一つの化合物であって、スルホン酸化合物およびニトロ化合物の両方を前記試料に添加する請求の範囲 1 記載の測定方法。

15

13. 前記酸化により発色する基質が、N,N,N',N',N',N',N'-ヘキサ(3-スルホプロピル)-4,4',4',4''-トリアミノトリフェニルメタンヘキサリテイウム塩、N,N,N',N',N',N',N'-ヘキサ(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタンヘキサリテイウム塩、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)3,7-ビス(シメチルアミノ)フェノチアシンナトリウム塩、10-(メチルアミノカルボニル)3,7-ビス(シメチルアミノ)フェノチアシンおよび10-(カルボキシアミノメチル-4-ヘンツアミノカルボニル)3,7-ビス(シメチルアミノ)フェノチアシンナトリウム塩からなる群から選択された少なくとも一つの化合物であって、少なくともスルホン酸化合物を前記試料に添加する請求の範囲 1 に記載の測定方法。

25

14. 測定対象物が、糖化タンパク質、糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸からなる群から選択された少なくとも一つである請求の範囲 1 記載

の測定方法。

15. 糖化タンパク質が、糖化ヘモグロビンである請求の範囲 14 記載の測定方法。

5

16. 前記試料が、赤血球の溶血試料である請求の範囲 1 記載の測定方法。

17. 前記試料に対するスルホン酸化合物の添加割合が、血球 1 体積

10 % に対して  $0.05 \sim 200 \text{ mmol/L}$  である請求の範囲 16 記載の測定方法。

18. 前記試料に対するニトロ化合物の添加割合が、血球 1 体積 % に

対して  $0.05 \sim 500 \text{ mmol/L}$  である請求の範囲 16 記載の測定

15 方法。

19. 前記試料に対するスルホン酸化合物およびニトロ化合物の添加

割合が、血球 1 体積 % に対してスルホン酸化合物  $0.05 \sim 200 \text{ mmol/L}$  、ニトロ化合物  $0.05 \sim 250 \text{ mmol/L}$  である請求の範囲

20 16 記載の測定方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/72, 33/66, 21/77, 31/00, C12Q1/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/72, 33/66, 21/77, 31/00, C12Q1/26Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-292795 A (LIFESCAN, INC.), 23 October, 2001 (23.10.01), & EP 1130111 A	1-19
X	JP 2000-093199 A (LIFESCAN, INC.), 04 April, 2000 (04.04.00), & EP 990706 B & US 6200773 A & KR 2000022930 A	1-19
X	JP 54-123096 A (Miles Laboratories Inc.), 25 September, 1979 (25.09.79), & GB 2014306 A & DE 2843539 A & FR 2421938 A & US 4119405 A & IT 1109214 A	1-19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "B" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 May, 2003 (20.05.03)Date of mailing of the international search report  
03 June, 2003 (03.06.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05486

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 61-000084 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 06 January, 1986 (06.01.86), (Family: none)	1-19

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/72, 33/66, 21/77, 31/00  
C12Q1/26

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/72, 33/66, 21/77, 31/00  
C12Q1/26

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-292795 A(ライフスキャン・インコーポレイテッド) 2001.10.23 & EP 1130111 A	1-19
X	JP 2000-093199 A(ライフスキャン・インコーポレイテッド) 2000.04.04 & EP 990706 B & US 6200773 A & KR 2000022930 A	1-19

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に旨及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

20.05.03

## 国際調査報告の発送日

03.06.03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵



2 J 9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	JP 54-123096 A(マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド) 1979.09.25 & GB 2014306 A & DE 2843539 A & FR 2421938 A & US 4119405 A & IT 1109214 A	1-19
A	JP 61-000084 A(和光純薬工業株式会社) 1986.01.06 (ファミリーなし)	1-19